

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory

Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucia Komárková

Metody preference ve výzkumu bolesti

Methods using preference in pain research

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. MVDr. Šimon Vaculín, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. srpna 2014

Podpis:

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. MVDr. Šimonu Vaculínovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc při vypracování této práce. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu při studiu.

Lucia Komárková

Abstrakt

Práce se věnuje možnosti zjištění neuropatické bolesti u laboratorních myší a potkanů. Neuropatická bolest je charakterizována vedle evokované alodynzie a hyperalgie také spontánní bolestí, zdůrazněnou afektivně-motivační složkou bolesti vedoucí až k depresivnímu chování. Spontánní bolest, bolest na podnětu nezávislá, je však nezjistitelná klasickými metodami, které měří práh bolesti. Cílem práce je popsat metodiky využívající volby preference ve výzkumu neuropatické bolesti. Zaměřili jsme se na tři metody – metodu podmíněné preference místa, metodu preference cukrové vody a metodu teplotní preference. První zmíněná metoda se snaží vytvořit asociaci mezi úlevou od bolesti a specifickým místem, které zvíře následně preferuje. Tato metoda podmíněné preference místa může sloužit k odhalení spontánních bolestí, které se manifestují většinou při neuropatické bolesti. Metoda preference cukrové vody sleduje pokles konzumace cukrové vody po působení chronické bolesti, což můžeme pokládat za anhedonii (symptom deprese), takže díky této metodě máme možnost prozkoumat interakce mezi bolestí a depresí. Metoda teplotní preference studuje změny preferencí mezi studenou a teplou podložkou po působení bolesti nebo po podání analgetik. Poznatky vycházející z preferenčních metod nám pomáhají prozkoumat všechny aspekty neuropatické bolesti a rozvíjet další možnosti léčby bolesti.

Klíčová slova:

Neuropatická bolest, podmíněná preference místa, teplotní preference, preference cukrové vody, práh bolesti.

Abstract

The thesis deals with neuropathic pain measurement in laboratory mice and rats. Neuropathic pain is characterized besides evoked allodynia and hyperalgesia also by spontaneous pain and anhedonia, further motivational-affective part of pain is highlighted. Traditional pain threshold testing is not appropriate method to measure these aspects of pain. Therefore, the aim of the thesis is to describe preference methods in pain research. We focused on three methods - conditioned place preference, sucrose preference test and thermal place preference. The first mentioned method creates an association between pain relief and a specific place, which afterwards the animal prefers. The conditioned place preference can be used to detect spontaneous pain. Sucrose preference test monitors decrease in consumption of sugar water after exposure to chronic pain, which can be interpreted as a sign of depression, so thanks to this method we have the opportunity to explore the interaction between pain and depression. The thermal place preference method studies changes of preferences between the cold and hot plate after induction of pain or analgesics. The findings based on preference methods help us to examine all aspects of neuropathic pain and develop more options for pain treatment.

Key words:

Neuropathic pain, conditioned place preference, thermal place preference, sucrose preference test, pain threshold.

OBSAH

ÚVOD	1
1 BOLEST A ZÁKLADNÍ POJMY	2
1.1 Definice bolesti a nocicepce	2
1.2 Dráhy vedení a inhibice bolesti	3
1.3 Typy bolesti	4
1.4 Složky bolesti	5
1.5 Obranný reflex.....	6
2 KLASICKÉ METODY MĚŘENÍ BOLESTI.....	7
2.1 Tail-flick test.....	7
2.2 Plantar test	9
3 PREFERENČNÍ METODY MĚŘENÍ BOLESTI	11
3.1 Klasické a operantní podmiňování	11
3.2 Metoda podmíněné preference místa.....	11
3.3 Metoda preference cukrové vody	15
3.4 Metoda teplotní preference	16
4 ZÁVĚR.....	18
5 LITERATURA	20

ÚVOD

Bolest je charakterizována jako nepříjemný komplexní vjem, který se skládá z několika složek. Zahrnuje v sobě jak složku senzickou, emoční tak i komponentu hodnotící. Bolest jako subjektivní zážitek je lehce ovlivnitelná psychikou a stresem. Pokud chceme bolest ovlivňovat, musíme nejdříve důkladně prostudovat ji i další související jevy. Jestliže chceme něco zkoumat, musíme znát vhodné metody. A zde nastává hlavní problém pramenící z definice bolesti jako subjektivního prožitku. Subjektivní vjemy nelze převést do objektivního měřítka, čili je nemůžeme kvantitativně měřit. Proto ve výzkumu bolesti neustále předpokládáme, že subjektivní zkušenosti jsou stejné, jako bychom získali my sami za stejných podmínek.

Většina metod ve výzkumu bolesti používajících pokusná zvířata provádí odhad prahu bolesti na základě reflexní únikové odpovědi, což ale umožňuje zkoumat pouze senzickou část bolesti. Preferenční metody nám umožní probádat i emoční stránku, protože nevyužívají práh bolesti, ale zjišťují specifické behaviorální projevy a z nich následně odhadují citové prožívání bolesti. Každá preferenční metoda je jiná a tak je nesnadné o nich mluvit obecně, metoda podmíněné preference místa zkoumá účinek určité látky na bolest, metoda preference cukrové vody se zajímá o depresivní projevy způsobené bolestí a metoda teplotní preference zjišťuje nepříjemnost teplotních stimulů při bolesti.

Cílem mojí práce bylo shrnutí dosavadní literatury na téma preferenčních metod ve výzkumu bolesti a zpracování krátké rešerše, která může posloužit pro případné následující studium. Pozornost si zaslouží i klasické metody měření bolesti, díky nimž můžeme lépe proniknout do problematiky výzkumu bolesti.

1 BOLEST A ZÁKLADÍ POJMY

1.1 Definice bolesti a nocicepce

Bolest můžeme definovat jako nepříjemnou emocionální a senzorickou zkušenost, doprovázenou přímým nebo potenciálním poškozením tkáně, nebo popisovanou výrazy takového poškození. Ovšem do definice bolesti spadá i složka subjektivní, díky níž je obtížné bolest přesně definovat a stává se tak individuální záležitostí (IASP, 1979).

I přesto, že bolest je nepříjemný smyslový vjem, můžeme na ni v některých případech nahlížet jako na přínosný fyziologický děj, který má funkci obrannou nebo funkci diagnostickou. Díky obranné funkci můžeme včas předejít poškození tkáně a diagnostická funkce hraje důležitou roli v klinické praxi. Problém nastane, pokud bolest svoji informativní složku ztratí a stane se z ní patologický stav bez jakéhokoliv užitku pro pacienta.

Nocicepce

Nocicepce je nervový proces, jehož výsledkem je pocit bolesti. Nocicepce zahrnuje aktivaci nociceptorů, vedení signálu nervovými vlákny a aktivaci různých oblastí v CNS. Nocicepce tedy není synonymem bolesti, představuje jen proces zaznamenání a vedení potenciálně škodlivého podnětu.

Nociceptory jsou volná nervová zakončení umístěná téměř ve všech tkáních těla a aktivují se stimulem, který může potenciálně poškodit tkáň (Loeser a Treede, 2008). Nociceptory představují velmi heterogenní skupinu neuronů. Můžeme je rozdělit na nociceptory vnímající teplotní, mechanické a chemické podněty (Basbaum a Jessell, 2000). Teplotní nociceptory rozlišujeme na tepelné a chladové podle teplotního rozmezí, na které reagují. Pro tepelné nociceptory je toto rozmezí mezi 35 a 45 °C a dochází u nich k expresi iontových kanálů rodiny TRPV (transient receptor potential - vanilloid) (Simone a Kajander, 1997). Chladové nociceptory se aktivují mezi 8 a 10 °C (Cain a spol., 2001) a nalézáme u nich iontové kanály převážně z rodiny TRPM (transient receptor potential - melastatin) (McKemy a spol., 2002). Tato teplotní rozmezí odpovídají hodnotám, při nichž může dojít k poškození tkání. Chemické nociceptory zaznamenávají přítomnost některých látek (např. H^+ , histamin, adenosintrifosfát, bradykinin, serotonin, substance P atd.) (Meyer a spol., 2008) pomocí receptorů a iontových kanálů jako jsou například ASIC (acid-sensing ion channel), které reagují na přítomnost H^+ (Krishtal, 2003), kanály P2X zaznamenávající molekuly adenosintrifosfátu, B2 kanály odpovídající na molekuly bradykininu a H1 kanály, které registrují výskyt histaminu. Mechanické nociceptory reagují na mechanické a tlakové podněty.

Některé stimuly poškozující tkáň ovšem nociceptory zaznamenat nedokážou. Týká se to například ultrafialového záření nebo rentgenových paprsků (Loeser a Treede, 2008). Bolest neucítíme ani po poškození jaterního, ledvinného nebo plicního parenchymu, které neobsahují volná nervová zakončení s nociceptory (Cervero, 1994).

1.2 Dráhy vedení a inhibice bolesti

Informace z nociceptorů je potřeba dovést do center, kde budou zpracovány. Děje se tak pomocí nervových vláken typů A a C, která přicházejí do míchy a po přepojení na další neuron pokračují do mozku. Vlákná typu A můžeme rozdělit na α , β , γ a δ , ze kterých se na vedení bolesti podílejí především δ vlákna, která jsou středně silná, myelinizovaná a vedou vzruchy střední rychlostí ($12-30 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). Jejich význam je především ve zprostředkování první fáze bolesti, která je popisována jako ostrá, dobře lokalizovatelná bolest. Typ C patří k vláknům tenkým a nemyelinizovaným, proto vedou vzruchy pomalu ($0,5-2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). Zajišťují vedení druhé vlny bolesti, tupé a špatně lokalizovatelné, zánětlivé bolesti. Vlákná $A\beta$ vedou za normálních okolností nebolestivé informace z mechanoreceptorů, ale po senzitivaci se účastní i vedení bolesti. Typ $A\beta$ se řadí mezi silná myelinizovaná vlákna, takže mohou obstarávat jak rychlé vedení bolesti ($30-100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), nebolestivého dotyku a vibrací, tak propriocepci (Handwerker a Kopal, 1993).

Výše zmíněná nocicepční vlákna vedou do zadních rohů míšních, přesněji do lamin I, II, V, VI a X dle Rexeda. V Rexedových vrstvách se dráhy bolesti přepojují na sekundární neurony a přecházejí na kontralaterální stranu. C a $A\delta$ vlákna míří především do vrstev I, II, V a X. Typ vláken $A\beta$ vysílá odbočky do I, II a V laminy, kde dochází k modulaci bolesti. Hlavní dráha vláken $A\beta$ je v zadních míšních provazcích a přepojuje se v mozkovém kmeni (Millan, 1999).

Bolestivá informace je v Rexedových vrstvách modulována pomocí WDR (wide-dynamic range) neuronů (Melzack a Wall, 1967). Bolestivý podnět je na míšní úrovni několikrát přiváděn k motorickým neuronům, čímž toto spojení umožňuje fungování obranného reflexního oblouku.

Do vyšších center jsou bolestivé informace přenášeny míšními aferentními drahami. Dráhy rozdělujeme na několik typů, z nichž si zde uvedeme jen ty nejdůležitější. Spinothalamická dráha zajišťuje projekci rychlé a ostré bolesti do thalamických oblastí, z nichž pak vede do kortikální oblasti somatosenzorické kůry, která vyhodnocuje, odkud bolest přichází. Dráha spinoretikulární vede tupou bolest do jader retikulární formace v prodloužené míše, následně pokračuje přes mediální části thalamu až do insulární a přední cingulární kůry.

Spinoparabrachiální dráhu můžeme rozdělit podle místa jejího zakončení (hypotalamus nebo amygdala) v limbickém systému na spinoparabrachiohypotalamickou a spinoparabrachioamygdalární. Jak spinoretikulární, tak i spinoparabrachiální dráhy vyhodnocují emoční složky bolesti (Millan, 1999).

Inhibiční systémy bolesti

V některých situacích je potřeba bolest tlumit, například při ohrožení života. Proto mimo nocicepce existují i mechanismy, které dokážou bolest modulovat. Oba systémy mezi sebou spolupracují a tvoří tak propojený celek. Jako základní centrum inhibičního systému se označuje periakveduktální šed' (PAG), která se nachází ve středním mozku a komunikuje jak s limbickým systémem, tak s laminou I (Willis, 1988). PAG a rostroventrální míchu spojují neurony, které iniciují inhibiční dráhy. Hlavními neurotransmitery inhibičních drah bolesti jsou noradrenalin a serotonin nebo endogenní opioidy (Stamford, 1995). Samotné tlumení bolesti je založeno na snížení koncentrace excitačních mediátorů (substance P, glutamát) nebo na výlevu inhibičních mediátorů (kyselina γ -aminomáselná, enkefaliny, endorfíny) (Basbaum a Fields, 1984) v zadních rožích míšních.

Existuje ovšem ještě jeden systém modulace bolesti, který je oproti výše zmíněnému rychlejší. Jedná se o teorii vrátkování poprvé popsanou Melzackem a Wallem (1967). Má se za to, že v dorzálních míšních rožích existují WDR neurony (transmisní buňky), které komunikují se senzorickými aferentními vlákny. Za normálního stavu vede transmisní buňka informaci o dotyku. Pokud jsou drážděny nociceptory a aktivuje se nocicepční aferentace, transmisní buňka se přepne do bolestivého módu a vede bolest. Pokud však následně dojde k nadměrnému dráždění dotykových receptorů, přepne se transmisní buňka opět do módu nebolestivého – dotykového, takže místo bolesti vede jen dotyk. Teorii vrátkování se vysvětlují některé běžně pozorované jevy, např. když si zvíře olizuje poraněnou končetinu apod.

1.3 Typy bolesti

Bolest jako komplexní vjem existuje v několika typech. Můžeme ji rozdělit dle určitých kritérií, přičemž se některé vymezené typy mohou navzájem překrývat. Podle kritéria času rozlišujeme bolest akutní a chronickou. Akutní bolest trvá sekundy až týdny (do 3 měsíců), vzniká většinou úrazem, chorobou nebo jako následek operace. Doprovází ji některé příznaky, jako jsou pocení, zrychlený tep, zvýšená dechová frekvence, vazokonstrikce atd. Chronickou bolestí označujeme bolest přetrvávající 3 měsíce nebo bolest trvající déle než je obvyklá doba

pro dané onemocnění (Merskey a Bogduk, 1994). Chronickou bolest často doplňují poruchy spánku, deprese a zhoršená kvalita života (Ohayon a Schatzberg, 2003).

Podle místa lokalizace odlišujeme bolest viscerální (útrobní) a somatickou, kterou můžeme dále rozčlenit na bolest povrchovou a hlubokou. Viscerální bolest vedou vlákna z útrobních orgánů, vnímáme ji jako tupou a obtížně lokalizovatelnou bolest. Viscerální bolest nemusí být nutně spojena s poraněním tkáně, vyvolávají ji většinou chemické podněty nebo distenze, naopak teplotní nebo tlakové poškození většinou nezaznamenáme, protože orgány neobsahují nociceptory pro tyto podněty. Útrobní bolest doprovázejí vegetativní reakce, pro příklad uveďme nevolnost nebo zvýšenou tenzi svalů (Cervero a Laird, 1999). Povrchová bolest vzniká drážděním kožních nociceptorů, je dobře lokalizovatelná a ostrá. Hluboká bolest se lokalizuje o něco hůře, vychází z periostu, svalů a kloubů.

Podle mechanismu vzniku rozeznáváme bolest nocicepční, neuropatickou a psychogenní. Nocicepční bolest, jak už název napovídá, vzniká podrážděním nociceptorů stimuly, které mohou poškodit tkáň. Neuropatická bolest se vyvíjí jako následek periferního nebo centrálního nervového poškození a často se řadí kvůli svému dlouhému trvání mezi bolesti chronické. Má se za to, že neuropatická bolest vzniká dlouhodobými změnami plasticity nocicepčních drah. Tyto změny týkající se periferních nociceptorů, synapsí zadních rohů míšních, podkorových jader a jader kortikálních vedou ve výsledku k senzitivizaci neuronů (Zhuo a spol., 2011). Typickým příkladem neuropatické bolesti je Fantomová bolest, která se projevuje u pacientů po amputaci končetiny nebo části těla. Pacienti pocítují bolest nebo nepříjemné pocity v amputované končetině, někdy tyto příznaky samy vymizí. Dříve se předpokládalo, že Fantomová bolest vzniká na základě přerušení nervových zakončení, dnes se zdůrazňuje vliv centrální nervové soustavy v utváření pocitu fantomové bolesti a její vzájemné ovlivňování periferním nervovým systémem (Subedi a Grossberg, 2011).

Zvláštním typem je bolest psychogenní, která nevzniká na nociceptorech, ale přímo v CNS, zřejmě v limbickém systému a mozkové kůře. Vyskytuje se pouze u lidí psychiatricky nemocných, kteří ji popisují jako velmi nepříjemnou, silnou a intenzivní bolest (Rokyta, 2009).

1.4 Složky bolesti

Jelikož je bolest komplexní vjem, rozlišujeme několik jejích složek: senzoricko-diskriminační (SD), afektivně-motivační (AM) a kognitivně-evaluační (KE) (Treede a spol., 1999). Nejvíce prozkoumanou je složka senzoricko-diskriminační, která nás informuje o tom, kde se bolest nachází a jak je intenzivní. Za SD složku odpovídá somatosenzorická kůra

(Basbaum a spol., 2009). Afektivně-motivační složka představuje emoční prožitek bolesti a udává, jak moc nám je bolest nepříjemná (Prince, 1999). Anatomickým substrátem AM složky jsou cingulární kůra, amygdala, insula a hypotalamus. Za kognitivně-evaluační složku odpovídají nespecifické asociační oblasti mozkové kůry, které vyhodnotí, zda je pro nás bolest výhodná, nebo není (Treede a spol., 1999).

1.5 Obranný reflex

Bolest je doprovázena obranným reflexem. Obranných reflexů je celá řada, ale v zásadě je můžeme popsat jako základní reflexy, které jsou iniciovány potenciálně škodlivým podnětem a vyvolávají obranné reakce vůči tomuto podnětu. Do obranného reflexu zasahují mícha, prodloužená mícha i vyšší mozkové struktury. Jako obranný reflex můžeme mimo jiného označit kašel, kýchání, mrkání, slzení, lízání končetiny a únikový reflex, na který se zaměříme. Míšní únikový reflex hraje významnou roli ve studiu bolesti při použití zvířecích modelů. Zaznamenáváme jej jako nepřímý ukazatel toho, kdy je podnět bolestivý a kdy ještě není. Únikový reflex má za úkol vzdálit tělo nebo jeho část od potenciálně škodlivého podnětu.

Reflex funguje prostřednictvím reflexního oblouku složeného z pěti základních složek: nociceptor, aferentní dráha, centrum, eferentní dráha a výkonný orgán (Sherrington, 1906). Iniciace únikového reflexu je zahájena na receptoru (nociceptoru), signál se šíří senzitivními aferentními dráhami do míchy, která tvoří centrum. Zde se signál přepojuje na několika segmentech a přechází také na druhou stranu míchy. Eferentní dráhy tvoří axony motoneuronu, které vedou stimul až ke svalům, kde vykonávají většinou flexi ipsilaterální a extenzi kontralaterální končetiny a tím pádem i odtažení od bolestivého podnětu (Kandel a spol., 2000). Jde o reflex polysegmentální (probíhající v několika segmentech) a polysynaptický (zahrnující více synapsí), který proběhne i u spinalizovaného zvířete (Steffens a Schomburg, 1993).

2 KLASICKÉ METODY MĚŘENÍ BOLESTI

Pro výzkum bolesti je stěžejní zaznamenávat vývoj či intenzitu bolesti a v lepším případě je kvantitativně měřit. Ovšem v tomto ohledu narážíme na mnohá úskalí, která primárně plynou z definice bolesti jako komplexního subjektivního zážitku, nejde tedy jen o senzorický vjem. Jak konstatovala McCaffery (1968), bolest je vše, co jako bolest označí pacient, a existuje, když to pacient tvrdí. Bolest a její existenci tedy nemůže posoudit jiná osoba než ta, která bolest pociťuje.

U zvířat není situace o nic méně komplikovanější, protože zvíře nám nemůže svoje subjektivní pocity bolesti sdělit, a můžeme tedy jen usuzovat z jeho somatických projevů. Nejčastěji se pozorují obranné reflexy zvířete nebo behaviorální znaky. Při pozorování behaviorálních znaků se soustředíme na změny chování zvířete, které se projevují například olizováním končetin, neklidem, přešlapováním, a zároveň můžeme také pozorovat změny mimiky zvířete a následně je hodnotit podle škály fotografií (Sotocinal a spol., 2011).

Pokud se zaměříme na záznam obranných reflexů, budeme ve skutečnosti ve většině případů měřit práh bolesti. Práh bolesti je určen jako minimální intenzita stimulace k vyvolání bolestivého vjemu (Gracely, 1999). Jinými slovy jde o rozhraní, které odděluje podnět nebolestivý od podnětu působícího bolest. Nejčastěji se používá podnět teplotní (tepelný nebo chladový) nebo mechanický. Zjišťování prahu bolesti probíhá tak, že se intenzita podnětu postupně zvyšuje a v momentě, kdy dosáhne prahu bolesti, vyvolá u zvířete obranné únikové reakce. Zaznamenáváme buď dobu do vyvolání reakce, nebo intenzitu potřebnou k vyvolání obranné reakce. Musíme ale při měření počítat s tím, že práh bolesti je u každého velmi individuální a ovlivňují ho vnější i vnitřní faktory. Vnitřní faktory mající dopad na práh bolesti jsou například menstruační cyklus, období říje nebo cirkadiánní rytmus (Martínez-Gómez a spol., 1994; Giamberardino a spol., 1997), z vnějších faktorů můžeme uvést teplotu okolí (Vitkova a spol., 2014). Na principu měření prahu bolesti je založeno nespočet výzkumných metod, v následujících kapitolách se zaměříme jen na tail-flick a plantar test, které patří k nejvýznamnějším a nejčastěji používaným.

2.1 Tail-flick test

Tail-flick test představuje nejstarší metodu používanou k měření prahu bolesti, ze které se vyvinulo několik dalších metod. Provádí se tak, že zvíře je fixováno v komůrce, ze které vede ocas na vodorovnou podložku, světelný paprsek ze shora míří na ocas, čímž ho zahřívá. Pokud stimul překročí práh bolesti, zvíře ocasem ucukne (D'Amour a Smith, 1941). Měříme čas od začátku působení tepelného stimulu po dobu iniciace únikové reakce, tento čas

nazýváme dobou latence. Příslušný fotosnímač změří dobu latence tak, že se po zapnutí světelného paprsku sám vypne při pohybu ocasu. Tail-flick test se využívá ve farmakologii ke zjišťování analgetických účinků různých látek (Amit a Galina, 1986).

Tento test je primárně navrhnut pro myši a potkany, kteří nemají ocas silně osrstěný. Místo na ocasu, kam směřuje světelný paprsek, se může černit, aby se předešlo variabilitě ve výsledcích, která může být způsobena odlišným odrazem světla závislým na barvě ozařovaného místa. Podle intenzity stimulace se aktivují různá nervová vlákna. Intenzita světelného paprsku má být nastavena tak, aby se doba latence pohybovala v rozmezí 7–10 vteřin. Nižší hodnoty latence se hůře statisticky hodnotí a u vyšších hodnot je riziko samovolného pohybu ocasu. Samozřejmě musíme zajistit, aby nedošlo k poškození tkáně, takže nastavíme horní hranici doby latence, po které se přístroj sám vypne. To zabraňuje poškození u zvířat pod vlivem silných analgetik (Bennett, 2001).

Některé faktory ovlivňují výsledky tail-flick testu, proto musíme jejich účinek při testování co nejvíce zmírnit nebo nejlépe zajistit jejich standardizované hodnoty. Klasicky světelný paprsek míří na špičku ocasu zvířete, kde se dosahuje nejnižších hodnot latence. Doba latence ovlivňuje i teplota kůže na ocase. Pokud je teplota kůže na ocase zvýšená, doba latence se zkracuje, což může být mylně vyhodnoceno jako hyperalgie. U snížené teploty kůže se doba latence zvyšuje (Hole a Tjølsen, 1993). Owens a spol. (2002) uvádějí, že optimální teplota kůže na ocasu je $37,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$. Samotný reakční čas je součtem fyzikálních, biofyzikálních a behaviorálních latencí, ve kterých se může promítnout účinek stresu vyplývající z fixace zvířete (Benoist a spol., 2008). Fixace zvířete se provádí rukou nebo umístěním do komůrky, ze které vede ven jen ocas. Po vyplavení stresových hormonů je zvíře méně citlivé na bolest, jde o stresovou analgezii. Dochází také ke snížení teploty ocasu vlivem stresové vazokonstrikce, čímž se doba latence prodlužuje (Dubner a Bennett, 1983). Tento stres jde elegantně zmírnit tak, že zvíře umístíme do komůrky pro plantar test, ve které se volně pohybuje. Doba latence měříme stejně jako u plantar testu (viz dále) jen s tím rozdílem, že neměříme na plantární straně končetin, ale na ocase. Tento modifikovaný tail-flick test sníží stresovou zátěž zvířete a tím pádem přinese přesnější výsledky (Beran a spol., 2010). Nedávno bylo zjištěno, že pohlaví experimentátora může ovlivnit výsledky testu, protože olfaktorické stimuly produkované muži zvyšují u hlodavců hladinu stresu (Sorge a spol., 2014).

Handicap tail-flick testu představuje fakt, že se při dlouhodobém nebo často opakovaném měření potkani naučí předcházet bolestivému vjemu tak, že uhnou ocasem ještě před dosažením jejich prahu bolesti (King a spol., 1997). Jde o odpověď, která je závislá na

zapojení vyšších supraspinálních systémů zajišťujících paměť a učení (Illich a spol., 1995). Také je nevýhodná rozdílnost prahů bolesti u odlišných genetických linií zvířat (Mathiasen a spol., 1987). Výše zmíněná teplota kůže na ocase může mást při testování léků, které způsobují vazodilataci či vazokonstrikci.

Tail-flick test má však své výhody. Jde o metodu velmi jednoduchou na provedení, v zásadě i rychlou a není potřeba žádné složité vybavení. Také pozorované ucuknutí ocasem je velmi dobře prostudovaným míšním reflexem (Irwin a spol., 1951), což představuje základní přednost pro experimentální manipulace, které mohou ovlivnit přenos nociceptivní informace.

2.2 Plantar test

Plantar test je založen na principu, který vychází z tail-flick testu, ale na rozdíl od něj se nevyužívá termoregulačního orgánu zvířete (ocasu), ale plantární strany končetin (Yeomans a Proudfit, 1994). Plantar test se provádí tak, že zvíře umístíme do plastového boxu se skleněným dnem a necháme cca 5-10 aklimatizovat. Využívá se tepelného stimulu ve formě paprsku, který je směřován na plantární stranu končetiny zvířete přes skleněné dno. Sledujeme únikovou obrannou reakci, kdy zvíře nejčastěji ucukne končetinou (Hargreaves a spol., 1988). Zaznamenáváme dobu latence, kterou změří přístroj sám (obdobně jako u tail-flick testu). Kromě únikové reakce sledujeme i jiné behaviorální projevy, např. lízání či chránění končetiny (Rácz a Zimmer, 2009). Doba latence je nepřímo úměrná k intenzitě stimulace (Tsuruoka a spol., 1988), po podání analgetik se doba latence prodlužuje. Naopak při přítomnosti bolesti (neuropatická bolest, zánět) se doba latence zkracuje a tento stav nazýváme hyperalgezií. Díky plantar testu můžeme tedy zjišťovat míru působení analgetik, přítomnost hyperalgezie, průběh reflexní odpovědi a mnohé další jevy.

Analogicky k tail-flick testu nastavíme optimální intenzitu světelného paprsku dle doby latence, která by se měla opět pohybovat v rozmezí 7 až 10 vteřin. Taktéž nastavíme horní hranici doby latence, po jejímž uplynutí světelný paprsek zhasne, abychom předešli poškození končetiny. Při opakovaném měření téže končetiny musíme dbát na dostatečný časový rozestup mezi jednotlivými měřeními.

V neprospěch plantar testu hraje roli proměnlivost teploty skleněného dna, na kterém je zvíře umístěno. Tento skleněný povrch působí jako tepelný zdroj nebo teplo pohlcuje v závislosti na teplotním gradientu (Hirata a spol., 1990), tudíž teplota povrchu dna může ovlivnit teplotu končetin (Berge a spol., 1988). Podle Diriga a spol. (1997) je optimální

teplota povrchu 30°C, při které se snižuje variabilita v dobách latence. Další nevýhodou plantar testu je nutnost udržovat povrch dna neustále čistý od moči a výkalů.

Nespornou výhodou je, že zvíře může být svojí vlastní kontrolou, protože můžeme zjišťovat zároveň dobu latence u zdravé i u experimentální končetiny na jednom zvířeti (Galbraith a spol., 1993). Další výhodou, ve které plantar test předčí tail-flick test, představuje menší stresová zátěž zvířete při testování, která je způsobena možností se volně pohybovat v boxu. Dosahujeme tak výsledků s přesnějšími hodnotami (Terman a spol., 1984).

Z modifikací plantar testu zmiňme například cold plantar test, při kterém se místo světelného paprsku aplikuje na plantární stranu končetiny přes skleněné dno kulička suchého ledu, což u zvířete vyvolá obdobnou obrannou reakci jako u stimulace tepelné a zjišťujeme tak citlivost na chlad za různých podmínek (Brenner a spol., 2012).

3 PREFERENČNÍ METODY MĚŘENÍ BOLESTI

Na rozdíl od metod využívajících práh bolesti se preferenční metody zakládají na komplexním emočním prožitku bolesti, do kterého se zapojují všechny složky – SD, AM i KE, a umožňují nám tak prozkoumat všechny stránky bolesti. Princip preferenčních metod spočívá ve sledování pokusných zvířat a jejich rozhodování mezi několika podněty, z čehož následně můžeme vyvodit preferenci nebo averzi pro sledovaný podnět. Po aplikaci bolesti nebo jiného stresu můžeme pozorovat změny v preferenci podnětů a dále tyto změny ovlivňovat podáním drog působících na bolest. Takto studujeme subjektivní vnímání bolesti pokusného zvířete a potažmo emoční stránku bolesti.

3.1 Klasické a operantní podmiňování

Všechny preferenční metody jsou založené na učení pomocí klasického nebo operantního podmiňování, při kterých se vytvářejí nové nervové spoje. Při klasickém podmiňování, které rozpracoval I. P. Pavlov, se učíme, že dané podněty nejsou nahodilé, ale existuje mezi nimi závislost, tedy že podmíněný podnět předchází v krátkém časovém intervalu nepodmíněnému podnětu (Pearce a Hall, 1980). Operantním podmiňováním se mimo jiné zabýval B. F. Skinner, který vycházel z prací E. L. Thorndikea. Princip operantního podmiňování se odvíjí od toho, že následky určitého chování vedou ke změně okolí a pokud je tato změna okolí pozitivní, zvyšuje se pravděpodobnost tohoto chování vedoucí k dané změně. Jde o učení pokusem a omylem, kdy uspokojivé důsledky chování mají vliv na jeho upevnění (McLeod, 2007).

Pro využití preferenčních metod nemůžeme použít kterýkoliv druh pokusných zvířat, ale pouze takový, který zvládne učení pomocí podmiňování. Při zkoumání účinků drog pomocí preferenčních metod je důležité, aby dané drogy neměly vliv na paměť a učení.

3.2 Metoda podmíněné preference místa

Metoda podmíněné preference místa vychází z faktu, že úleva od bolesti je pro zvíře vždy užitečná. Tato metoda se tedy snaží vytvořit asociaci mezi specifickým místem a úlevou od bolesti zprostředkovanou určitou drogou. Děje se tak procesem klasického podmiňování, který využívá efekt úlevy od bolesti jako nepodmíněného podnětu a stimulu specifického pro místo jako podmíněného podnětu (King a spol, 2009). Předpokládáme tak, že pokud zvíře tuto úlevu od bolesti vyhledává, přenesení se tento jev i na specifické místo, kde úlevu od bolesti zažilo, a zvíře bude vykazovat preferenci tohoto místa, pokud dostane možnost výběru. Můžeme tak sledovat efekt drogy na bolest, což se projeví jako preference nebo averze místa

(Prus a spol., 2009). Preference místa by se měla vytvořit jen u zvířat s bolestí, u kontrol nikoliv (King a spol., 2009). Jako pokusná zvířata se obvykle používají laboratorní myši nebo potkani.

Klasické zařízení pro metodu podmíněné preference místa sestává z boxu rozděleného do dvou nebo tří komor, kdy dvě komory se nachází na vnějších stranách a třetí komora je uprostřed nebo není vůbec. Vnější komory mají odlišný design, aby zvíře poznalo, ve které z nich právě je a bylo možno tak vytvořit asociaci mezi drogou a jednou z komor. Komory se většinou liší barvou zdí, podestýlkou, strukturou podlahy a podobně. Prostřední komora nemá žádné speciální znaky, neasociuje se s drogou ani s fyziologickým roztokem a je oddělitelná od obou postranních komor.

Metoda podmíněné preference místa má několik fází, které následují za sebou v tomto pořadí – habituace, testování před podmiňováním, podmiňování a testování po podmiňování (Obara a spol., 2013). Habituace probíhá tak, že na určitý čas během několika dní má zvíře umožněn volný pohyb po celém komorovém zařízení. Má tedy čas zařízení prozkoumat a zvyknout si tak na něj. Redukuje se tím variabilita způsobená novým neznámým prostředím.

Fázi habituace můžeme zakončit fází testování před podmiňováním. Při tomto testování má zvíře opět umožněn pohyb po celém zařízení, ale měříme čas, který stráví v každé z postranních komor. Zjišťujeme tak základní preferenci místa pro individuální zvíře. Pokud tuto fázi vynecháme a nebudeme brát v úvahu základní preferenci komor, bude záležet na rozhodnutí výzkumníka, kterou komoru bude asociovat s drogou. Dřívější studie tuto fázi vynechávaly a vznikaly tak nesrovnalosti v působení určitých látek. Calcagnetti a Schechter (1994) si toho také povšimli a rozhodli se udělat experiment ohledně efektu nikotinu. Testováním před podmiňováním určili u každého zvířete preferovanou komoru. Došli k závěru, že pokud k navázání asociace vyberou méně preferovanou komoru, vytvoří se preference pro tuto komoru. Pokud ovšem vyberou komoru více preferovanou, nevytvoří se signifikantní preference ani averze, což může být důvod rozdílných výsledků mezi studiemi.

Po testování základní preference následuje fáze podmiňování, která probíhá většinou tak, že zvířeti s bolestí podáme zkoumanou látku a umístíme ho do zvolené postranní komory, která je oddělená od ostatních komor, takže zvíře setrvává jen ve zvolené komoře. Zvíře ponecháme stanovený čas v této komoře, ve které by měla podaná droga účinkovat a vytvořit tak preferenci nebo averzi pro danou komoru. Další den podáme zvířeti pouze fyziologický roztok a umístíme ho do opačné komory, než se kterou je asociována droga. Tento postup opakujeme několik dní v závislosti na tom, o jakou drogu se jedná a jak je experiment namodelován (Prus a spol., 2009). Pokud jde o drogu s pomalým nástupem a dlouhým

intervalem působení, tak se preference nevytváří tak snadno a je potřeba podmiňování věnovat více dní než při použití drog, které působí rychle. Také interval mezi podáním látky a vložením do komory by neměl být příliš dlouhý, jinak se nemusí preference místa vůbec vytvořit (Pliakas a spol., 2001).

Závěrečná fáze, testování po podmiňování, probíhá den po ukončení podmiňování. Zvíře bez jakékoliv podané látky vložíme do zařízení (nejlépe do startovací, prostřední komory, pokud je přítomna), kde se může opět volně pohybovat, a měříme čas, který stráví v každé komoře. Na základě procenta stráveného času v každé komoře odvodíme efekt drogy. Pokud zvíře s bolestí strávilo signifikantně více času v komoře asociované s drogou než kontrolní zvíře bez bolesti, předpokládáme, že droga zajišťuje úlevu od bolesti. Pokud se zvíře s bolestí rozhodlo pro opačnou komoru, vytvořila se pravděpodobně averze na drogu, která pocit bolesti zhoršuje nebo způsobuje jiné nepříjemné pocity.

Při navrhování experimentu musíme vhodně zvolit znaky pro odlišení vnějších komor. Například klasické použití bílých zdí v jedné komoře a černých zdí v druhé se ukazuje jako rušivé, neboť existuje značná preference pro komoru s černými zdmi (Roma a Riley, 2005), proto se nově využívá černo-bílé pruhování a to buď vertikálně nebo horizontálně (Davoody a spol., 2011). Některé druhy rozpoznávacích podnětů nejsou pro určitá zvířata vhodná, například vizuální podněty pro albinotické potkany nepředstavují nejlepší volbu, naopak olfaktorické podněty jsou příhodnější. Také sluchové a hmatové stimuly jsou doporučované pro hlodavce. Podle míry rozlišitelnosti obou komor se odvíjí i časový interval potřebný pro fázi habituace. U dobře odlišitelných komor postačuje méně dní k habituaci, než u komor hůře rozeznatelných.

Výběr počtu komor zařízení je opět faktorem ovlivňujícím výsledky. Při závěrečném testování dvoukomorové zařízení umožňuje pouze nucenou volbu, kdy zvíře buď bude v komoře asociované s drogou, nebo v komoře neasociované a tak dává najevo buď preference, nebo averzi na drogu. U tříkomorového systému je přítomna prostřední komora, tzv. startovací. Při závěrečném testování zvíře může zvolit některou z postranních komor (preference/averze) nebo může trávit nejvíce času v prostřední komoře a být tak nerozhodnuté (Tzschentke, 2007). Je tak nutné zvážit výběr vhodného zařízení.

Metoda podmíněné preference místa byla původně využívána při studiu drogové závislosti. Výzkumy využívající metodu podmíněné preference místa dnes ale zahrnují nejen zkoumání bolesti, ale také studování neurotransmiterů, genové exprese, signalizačních drah a dalších mechanismů souvisejících většinou s efektem odměny, který droga vyvolává prostřednictvím

zvýšení hladiny dopaminu v mezolimbickém dopaminergním systému (Hoffman a Beninger, 1989).

Při použití při výzkumu bolesti musíme pocit bolesti určitým způsobem namodelovat. Pokud chceme studovat akutní bolest, používá se nejčastěji injekce formalinu pod kůži před podáním zkoumané látky (Suzuki a spol., 2001). Velkého zájmu dnes dosahují i bolesti modelované pomocí podání chemoterapeutik (Park a spol., 2013). Při výzkumech chronické neuropatické bolesti se obvykle provádí podvázání sedacího nervu (LaBuda a Fuchs, 2000). Při neuropatických bolestech se běžně projevuje bolest spontánní, čili na podnětu nezávislá bolest, kterou můžeme odhalit právě metodou podmíněné preference místa. Zajímavou možností je i porovnávání účinků dvou látek mezi sebou, kdy jednu drogu spárujeme s jednou komorou a obdobně druhou látku s opačnou komorou (Patkina a Zvartau, 1998). Další alternativu metody podmíněné preference místa představuje experimentální studování oblastí mozku hrajících roli v bolesti za pomoci vytváření lézí a poškození v daných oblastech a následného zkoumání, jak toto poškození ovlivnilo vnímání bolesti (Johansen a spol., 2001).

Mezi limitace a faktory ovlivňující výsledky patří volba podnětů odlišujících komory, výběr zařízení a drogy, u které velmi záleží na velikosti dávky. Nízké dávky některých drog vyvolají preferenci, ovšem vysoké dávky způsobují averzi. Další nevýhodou je fakt, že metoda není ověřena pro testování na lidech nebo primátech (Bardo a Bevins, 2000).

Metoda má ovšem i mnoho výhod a kladů, např. fakt, že závěrečné testování probíhá bez podání drogy, takže nejsou ovlivněny motorické schopnosti zvířete, které by mohly zkreslit výsledky. Metoda se také vyznačuje citlivostí i k nízkým dávkám drogy a primárně nevyžaduje chirurgický zákrok. Výhodou představuje i to, že měří zároveň preferenci i averzi (Carr a spol., 1989).

Jak jsme se dříve zmínili, bolest jako komplexní vjem se sestává z několika složek, z nichž nejvíce prozkoumaná je složka senzoricko-diskriminační. Tato složka byla důkladně probádána hlavně díky metodám využívající práh bolesti, ovšem metoda podmíněné preference místa práh bolesti nepoužívá. Zjišťuje efekt látek na vjem bolesti skrze pocity a emoce, proto se díky ní dozvídáme daleko více o afektivně-motivační složce bolesti. O této složce bolesti toho zatím víme poměrně málo, což je zapříčiněno i tím, že nebyl objeven žádný vhodný zvířecí model, který by nám umožnil tuto složku zkoumat důkladněji (Tzschentke, 2007). Metoda specificky zjišťuje bolest jako emocionální zkušenost, proto může sloužit i k odhalení spontánní bolesti (Davoody, 2011), kterou hlodavci svých chováním nedávají najevo (Stasiak a spol., 2003). A tak se hlavní předností metody podmíněné preference místa stává právě možnost prozkoumat spontánní bolesti.

3.3 Metoda preference cukrové vody

Ačkoliv je metoda preference cukrové vody ve výzkumu bolesti málo využívaná, představuje další možnost jak zkoumat emoční stránku bolesti. Metoda se provádí nejčastěji podle Willnera a jeho kolegů (1987) a to tak, že se pokusným zvířatům (laboratorním myším nebo potkanům) umístí do klece dvě předem zvážené láhve. Jedna obsahuje 1% roztok sacharózy ve vodě a druhá jen čistou vodu. Každé pokusné zvíře má volný výběr mezi láhvemi a volný přístup k nim po určitý časový interval, po jehož uplynutí se láhve opět zváží, čímž se zjistí úbytek v každé z nich. Umístění láhví v kleci se doporučuje pravidelně měnit, aby se předešlo zvyknutí si na jedno místo, ve kterém preferovaná láhev je. Součet spotřeby čisté vody a cukrové vody dává celkový příjem vody. Preference cukrové vody je vyjádřena v procentech jako podíl příjmu cukrové vody k celkovému příjmu vody.

Takto zjistíme základní preferenci cukrové vody, která dosahuje až 90 %. Nestresovaní potkani, kteří mají na výběr mezi cukrovou a normální vodou, přijímají přibližně 50 % kalorického příjmu z cukrové vody a zbytek kalorického příjmu z potravy (Kanarek a spol., 2001). Po aplikaci dlouhodobějšího nebo opakovaného stresu se preference sníží cca na 65 % (Urban a spol., 2011). Můžeme tedy sledovat, o kolik se preference sníží u daného stresu a jaký účinek bude mít na preferenci podaná droga. Při využití ve výzkumu bolesti jako stresor působí bolest chronická nebo opakovaná akutní bolest (Wang a spol., 2011). Přítomnost bolesti zajišťujeme podobně jako u metody preference místa, po zjištění základní míry preference cukrové vody. Po aplikaci antidepresiv nebo látek zmírňujících bolest se preference pro cukrovou vodu zvýší.

Snížení preference cukrové vody se přikládá jako následek anhedonie, což je behaviorální znak snížené radosti, která je jedním ze symptomů deprese (Castagné a spol., 2011). Anhedonii můžeme charakterizovat také jako neschopnost prožívat kladné emoce a odpovídat na odměnu. Anhedonii u potkanů a myší vyvolávají stresující faktory, jako například nedostatek potravy, znečištěná klec, bolest atd. Anhedonie pozorovaná u lidí je analogická k anhedonii u zvířat (Anisman a Matheson, 2005) a můžeme ji měřit několika metodami, z nichž preference cukrové vody patří k nejčastěji používaným testům, protože je nejméně technicky náročná (Papp a spol., 1991). Interakce bolesti a deprese není plně prozkoumaná, takže metoda preference cukrové vody představuje možnost jak tuto interakci lépe probádat. Výsledky ukazují, že prevalence deprese je vyšší u pacientů s bolestí než bez bolesti (Ohayon a Schatzberg, 2003) a že deprese sama o sobě zvyšuje riziko vzniku chronické bolesti (Korff a Simon, 1996).

Limitace metody preference cukrové vody představuje fakt, že se příjem sacharózy liší u jednotlivých genetických linií pokusných zvířat, což může vyvolávat nesrovnalosti mezi výsledky různých laboratoří (Bachmanov a spol., 1997). Další nevýhodou je to, že nejde o zavedený protokol, takže můžeme nalézt různé modifikace testu, o jejichž dopadu na výsledky testu nic nevíme. Dalším ovlivňujícím faktorem je to, že počáteční preference i konečná preference cukrové vody jsou závislé na koncentraci sacharózy (Matthews a spol., 1995).

K výhodám metody patří průběh testování v přirozeném prostředí zvířete (většinou v chovné kleci) a možnost sledovat časový průběh působení určité látky na vývoj anhedonie. Samozřejmě nejvíce oceňovaným kladem metody je schopnost sledovat emoční složku bolesti, která stojí v centru všeobecného zájmu.

Wang a jeho kolegové (2011) doporučují metodu využívat rutinně jako doplňující test při hodnocení bolesti u zvířat. Nejčastějšího použití nalezne metoda v oblasti farmakologie při výzkumu antidepresiv nebo na poli neurochemie.

3.4 Metoda teplotní preference

Metoda teplotní preference představuje modifikaci plantar testu, s tím, že se nevyužívá reflexní odpovědi, ale sleduje se komplexní motorická odpověď, pro kterou jsou nutná vyšší nervová centra (Mauderli a spol., 2000). Metoda teplotní preference je tak další možností jak prozkoumat afektivně-motivační povahu bolesti. Provádí se tak, že do komory s teplotně rozdílnou podlahou umístíme pokusné zvíře a sledujeme, na které podlaze se více zdržuje. Z toho usuzujeme, která teplota je mu více nepříjemná a kterou naopak preferuje. Na rozdíl od plantar testu můžeme u metody teplotní preference použít nižších teplot stimulů a delšího působení a následně tak zjišťovat citlivost aktivace nociceptorů (Vierck a spol., 2002).

Pro testování potřebujeme dvě hliníkové plotny, navzájem oddělené izolantem, aby nedocházelo k přenosu tepla. Plotny musí být teplotně regulovatelné, většinou jedna plotna je zahřívána a druhá ochlazována na požadovanou teplotu. Plotny oddělíme od okolí například plexisklem a vytvoří se tak komora s podlahou z těchto ploten. Jako pokusná zvířata se používají laboratorní myši nebo potkani.

Úvodní fází testování je fáze habituace, kdy si zvířata zvykají na testovací zařízení a teplota obou ploten je nastavena na neutrální hodnotu (např. teplotu končetin). Při této fázi se také zjišťuje čas strávený na každé plotně, z čehož vyvodíme základní míru preference při neutrální teplotě. Následuje fáze před testováním, kdy se nastavuje rozmezí testovacích teplot. Děje se tak postupným měněním teploty na každé plotně, aby se dosáhlo stabilní úrovně

preference – přibližně 50% obsazenosti každé plotny (Vierck a spol., 2002). Jedna plotna by měla být averzivně studená a druhá averzivně teplá. Smyslem je, aby míra averze byla na začátku pokusu shodná pro obě plotny. Při závěrečné fázi testování jsou teploty ploten nastaveny na hodnoty zjištěné při fázi před testováním (nejčastěji v rozmezí 0 až 5°C pro jednu plotnu a v rozmezí 45 až 50°C pro druhou). Po vyvolání bolesti nebo podání analgetik sledujeme dobu setrvávání na každé plotně, počet přechodů mezi plotnami, dobu latence do prvního přechodu a behaviorální projevy jako jsou lízání končetin apod. Z naměřených dat vyhodnotíme míru preference pro každou plotnu a tím pádem pro každou teplotu.

Teplotní preferenci ovlivňuje několik faktorů vnějších (teplota okolí) i vnitřních (pohlaví, tělesná teplota) (Vierck a spol., 2008). Chronická nebo opakovaná bolest a stres způsobují změny ve vnímání nociceptivních stimulů, můžou tedy modulovat teplotní preferenci. Při využití ve výzkumu bolesti modelujeme bolest před závěrečnou fází testování a způsobem obdobným jako u ostatních preferenčních metod. Teplotní preferenci u zvířat s bolestí posuzujeme vzhledem k teplotní preferenci kontrolních zvířat. Následně můžeme aplikovat látku působící na bolest a sledovat změny v teplotní preferenci (Walczak a Beaulieu, 2006). Pokud se například u pokusného zvířete v přítomnosti bolesti projeví chladová alodynie (chladový stimul, který běžně bolest nevyvolává, u něj bolest vyvolá) a po aplikaci drogy tato alodynie zmizí, můžeme usuzovat, že látka zajišťuje úlevu od bolesti. Aplikaci drogy provádíme většinou první a čtvrtý den měření, druhý a třetí den podáváme jen fyziologický roztok. Metodu teplotní preference můžeme využít i ve výzkumu molekulární a genetické podstaty nocicepce (Shimizu a spol., 2005).

Hendikepem metody teplotní preference může být to, že podání některých látek ovlivní výsledky, aniž by měly vliv na bolest. Například látky, které působí na termoregulaci, nejsou vhodné. Stejně tak látky se sedativním účinkem můžou mít dopad na motorickou aktivitu zvířete a tím pádem ovlivnit přecházení mezi plotnami, vnímání stimulů i behaviorální projevy. Také je důležité si uvědomit, že metoda teplotní preference neměří skutečnou citlivost na teplotní podněty, ale pouze preferenci nebo averzi k tepelným stimulům (Walczak a Beaulieu, 2006).

Výhod existuje hned několik a hlavní z nich jsme si již jmenovali, totiž tu, že máme možnost zjistit něco víc o emoční stránce bolesti, protože pracujeme s komplexní motorickou odpovědí a pokusné zvíře má možnost volby. Také je zmírněn stres a jeho důsledky tím, že se zvíře v komoře volně pohybuje. Celkově metoda představuje důležitou součást výzkumu detekce teploty, která je u savců kritickou funkcí pro udržení teplotní homeostaze (Colburn a spol., 2007).

4 ZÁVĚR

Preferenční metody nevyužívají zaznamenávání obranného reflexu nebo behaviorálních projevů doprovázejících bolest u pokusných zvířat, ale sledují komplexní motorickou odpověď, díky které manifestuje zvíře svoji volbu, preferenci některých podnětů a tím pádem i subjektivní emoce. Pokud pokusnému zvířeti způsobíme bolest, může se daná preference změnit a z toho jsme schopni posoudit intenzitu bolesti, eventuálně porovnávat intenzitu bolestí mezi sebou. Další změnu preference můžeme zajistit podáním látek ovlivňujících vnímání bolesti nebo působící na psychický stav a tak zjišťovat účinky těchto látek.

Metoda podmíněné preference místa je založena na klasickém podmiňování a tak spojuje úlevu od bolesti se specifickým místem, kde se tato úleva projeví pomocí podání drog. Tato procedura je několikrát opakována, aby se zvíře mohlo naučit tyto dva jevy spojovat. Následně, má-li zvíře možnost výběru z několika míst, pozorujeme, zda místo asociované s drogou preferuje nebo nikoliv. Pokud ano, vytvořila se preference pro toto místo a droga zajistila úlevu od bolesti. Pokud ne, může droga pocit bolesti zhoršovat nebo nemusí účinkovat vůbec. Metoda podmíněné preference místa má největší potenciál odhalit spontánní bolesti, které u pokusných zvířat můžeme jen obtížně rozpoznat. Kromě použití na poli farmakologie a výzkumu bolesti, se tato metoda uplatňuje jak v dalších oblastech neurobiologie, tak i například při zkoumání genové exprese.

Metoda preference cukrové vody zkoumá interakci bolesti a deprese, která je všeobecně málo prozkoumaná. Metoda je založena na sledování poklesu konzumace cukrové vody po působení chronické bolesti, což je zapříčiněno anhedonií. Anhedonii můžeme označit jako neschopnost prožívat kladné emoce a jedná se o jeden ze symptomů deprese. Pokud depresi způsobenou bolestí nebo samotnou bolest u pokusného zvířete zmírníme podáním určité drogy, můžeme pozorovat vzestup konzumace cukrové vody. Tato metoda se využívá hlavně při výzkumu antidepresiv a depresivních stavů doprovázejících bolest.

Jako poslední je zmíněna metoda teplotní preference založená na operantním podmiňování. V komoře s teplotně rozdílnými podlahami sledujeme pokusné zvíře a měříme, na které podlaze se více zdržuje. Tato teplotní preference se mění v přítomnosti bolesti nebo látek působících na tuto bolest. Můžeme usuzovat, které teplotní stimuly při dané bolesti vyvolávají alodynii a jak tuto alodynii ovlivní podání studovaných látek.

U všech metod sledujeme subjektivní prožívání bolestivých vjemů a tak se dostáváme k emoční stránce bolesti, která je zatím jen málo prozkoumaná. Proto je nasnadě se preferenčním metodám dále věnovat, využívat jich jako hodnotících metod bolesti a pracovat

na zkoumání faktorů a limitací, které mohou ovlivnit výsledky. Zároveň poznatky z výsledků preferenčních metod jsou hodnotné ukazatele při léčbě bolesti.

5 LITERATURA

AMIT, Zalman; GALINA, Z. Harry. Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression. *Physiological reviews*, 1986, 66.4: 1091-1120.

ANISMAN, Hymie; MATHESON, Kim. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2005, 29.4: 525-546.

BACHMANOV, Alexander A.; REED, D. R.; NINOMIYA, Y.; INOUE, M.; TORDOFF, M. G.; PRICE, R. A. & BEAUCHAMP, G. K. Sucrose consumption in mice: major influence of two genetic loci affecting peripheral sensory responses. *Mammalian genome*, 1997, 8.8: 545-548.

BARDO, M. T.; BEVINS, Rick A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward?. *Psychopharmacology*, 2000, 153.1: 31-43.

BASBAUM, Allan I.; FIELDS, Howard L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual review of neuroscience*, 1984, 7.1: 309-338.

BASBAUM, Allan I.; JESSELL, Thomas M. The perception of pain. *Principles of neural science*, 2000, 4: 472-491.

BASBAUM, Allan I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G. & JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 2009, 139.2: 267-284.

BENNETT, Gary J. 4 Animal Models of Pain. *Methods in pain research*, 2001, 67.

BERAN, Tomáš; VACULÍN, Šimon; FRANĚK, Miloslav. Srovnání dvou metod měření termického prahu bolesti na ocase laboratorního potkana. *Bolest*, 2010, 13.3: 124-127.

BERGE, Odd-Geir; GARCIA-CABRERA, Inmaculada; HOLE, Kjell. Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neuroscience letters*, 1988, 86.3: 284-288.

BRENNER, Daniel S.; GOLDEN, Judith P.; GEREAU IV, Robert W. A novel behavioral assay for measuring cold sensation in mice. *PloS one*, 2012, 7.6: e39765.

CAIN, David M.; KHASABOV, Sergey G.; SIMONE, Donald A. Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *Journal of neurophysiology*, 2001, 85.4: 1561-1574.

CALCAGNETTI, Daniel J.; SCHECHTER, Martin D. Nicotine place preference using the biased method of conditioning. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 1994, 18.5: 925-933.

CARR, G. D.; FIBIGER, H. C.; PHILLIPS, A. G. Conditioned place preference as a measure of drug reward, Lieberman JM, Cooper SJ, The Neuropharmacological Basis of Reward, 1989, 264-319.

CASTAGNÉ, Vincent; MOSER, P.; ROUX, S. & PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current protocols in neuroscience*, 2011, 8.10 A. 1-8.10 A. 14.

- CERVERO, Fernando. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiological reviews*, 1994, 74.1: 95-138.
- CERVERO, Fernando; LAIRD, Jennifer. Visceral pain. *The Lancet*, 1999, 353.9170: 2145-2148.
- COLBURN, Raymond W.; LUBIN, M. L.; STONE Jr, D. J.; WANG, Y.; LAWRENCE, D.; D'ANDREA, M. R. & QIN, N. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*, 2007, 54.3: 379-386.
- D'AMOUR, Fred E.; SMITH, Donn L. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1941, 72.1: 74-79.
- DAVOODY, Leyla; QUITON, R. L.; LUCAS, J. M.; JI, Y.; KELLER, A. & MASRI, R. Conditioned place preference reveals tonic pain in an animal model of central pain. *The Journal of Pain*, 2011, 12.8: 868-874.
- DIRIG, David M.; SALAMI, A.; RATHBUN, M. L.; OZAKI, G. T. & YAKSH, T. L. Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *Journal of neuroscience methods*, 1997, 76.2: 183-191.
- DUBNER, Ronald; BENNETT, Gary J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annual review of neuroscience*, 1983, 6.1: 381-418.
- GALBRAITH, James A.; MROSKO, Bruce J.; MYERS, Robert R. A system to measure thermal nociception. *Journal of neuroscience methods*, 1993, 49.1: 63-68.
- GIAMBERARDINO, Maria Adele; BERKLEY, K. J.; IEZZI, S.; DE BIGONTINA, P. & VECCHIET, L. Pain threshold variations in somatic wall tissues as a function of menstrual cycle, segmental site and tissue depth in non-dysmenorrheic women, dysmenorrheic women and men. *Pain*, 1997, 71.2: 187-197.
- GRACELY, R. H. Pain measurement. *Acta anaesthesiologica scandinavica*, 1999, 43.9: 897-908.
- HANDWERKER, H. O.; KOBAL, G. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiological Reviews*, 1993, 73.3: 639-671.
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C. & JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 1988, 32.1: 77-88.
- HIRATA, H.; PATAKY, A.; KAJANDER, K.; LAMOTTE, R. H. & COLLINS, J. G. A model of peripheral mononeuropathy in the rat. *Pain*, 1990, 42.2: 253-254.
- HOFFMAN, Diane C.; BENINGER, Richard J. The effects of selective dopamine D1 or D2 receptor antagonists on the establishment of agonist-induced place conditioning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1989, 33.2: 273-279.

HOLE, Kjell; TJØLSEN, Arne. The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor. *Pain*, 1993, 53.3: 247-254.

IASP, IASP. subcommittee on taxonomy. Pain terms. A list with definitions and notes on usage. *Pain*, 1979, 6.3: 249-52.

ILLICH, Paul A.; KING, Tamara E.; GRAU, James W. Impact of shock on pain reactivity: I. Whether hypo-or hyperalgesia is observed on how pain reactivity is tested. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 1995, 21.4: 331.

IRWIN, Samuel; BENNETT, D. R.; HENDERSHOT, L. C.; SEEVERS, M. H. & HOUDE, R. W. The effects of morphine, methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1951, 101.2: 132-143.

JOHANSEN, Joshua P.; FIELDS, Howard L.; MANNING, Barton H. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98.14: 8077-8082.

KANAREK, Robin B.; MANDILLO, Silvia; WIATR, Claudia. Chronic sucrose intake augments antinociception induced by injections of mu but not kappa opioid receptor agonists into the periaqueductal gray matter in male and female rats. *Brain research*, 2001, 920.1: 97-105.

KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. (ed.). *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill, 2000.

KING, Tamara; VERA-PORTOCARRERO, L.; GUTIERREZ, T.; VANDERAH, T. W.; DUSSOR, G.; LAI, J. & PORRECA, F. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nature neuroscience*, 2009, 12.11: 1364-1366.

KING, Tamara E.; JOYNES, Robin L.; GRAU, James W. Tail-flick test: II. The role of supraspinal systems and avoidance learning. *Behavioral neuroscience*, 1997, 111.4: 754.

KORFF, M. Von; SIMON, Gregory. The relationship between pain and depression. *British Journal of Psychiatry*, 1996, 168.30: 101-108.

KRISHTAL, Oleg. The ASICs: signaling molecules? modulators?. *Trends in neurosciences*, 2003, 26.9: 477-483.

LABUDA, Christopher J.; FUCHS, Perry N. A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. *Experimental neurology*, 2000, 163.2: 490-494.

LOESER, John D.; TREEDE, Rolf-Detlef. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*, 2008, 137.3: 473-477.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, Margarita; CRUZ, Y.; SALAS, M.; HUDSON, R. & PACHECO, P. Assessing pain threshold in the rat: changes with estrus and time of day. *Physiology & behavior*, 1994, 55.4: 651-657.

- MATHIASSEN, Joanne R.; RAFFA, Robert B.; VAUGHT, Jeffry L. C57BL/6J-bg^{< sup>}J(beige) mice: Differential sensitivity in the tail flick test to centrally administered MU-and delta-opioid receptor agonists. *Life sciences*, 1987, 40.20: 1989-1994.</sup>
- MATTHEWS, Keith; FORBES, Naida; REID, Ian C. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiology & behavior*, 1995, 57.2: 241-248.
- MAUDERLI, Andre P.; ACOSTA-RUA, Antonio; VIERCK, Charles J. An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *Journal of neuroscience methods*, 2000, 97.1: 19-29.
- MCCAFFERY, Margo. *N-110B Clinical Nursing: Nursing Practice Theories Related to Cognition, Bodily Pain, and Man-environment Interactions*. Regents of the University of California, 1968.
- MCKEMY, David D.; NEUHAUSSER, Werner M.; JULIUS, David. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 2002, 416.6876: 52-58.
- MCLEOD, Saul. Skinner: Operant Conditioning. *Simply Psychology*, 2007.
- MELZACK, Ronald; WALL, Patrick D. Pain mechanisms: a new theory. *Survey of Anesthesiology*, 1967, 11.2: 89-90.
- MERSKEY, Harold; BOGDUK, Nikolai. Classification of chronic pain, IASP Task Force on Taxonomy. *Seattle, WA: International Association for the Study of Pain Press*, 1994.
- MILLAN, Mark J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology*, 1999, 57.1: 1-164.
- OBARA, Ilona; GOULDING, S. P.; HU, J. H.; KLUGMANN, M.; WORLEY, P. F. & SZUMLINSKI, K. K. Nerve injury-induced changes in Homer/glutamate receptor signaling contribute to the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain*, 2013, 154.10: 1932-1945.
- OHAYON, Maurice M.; SCHATZBERG, Alan F. Using chronic pain to predict depressive morbidity in the general population. *Archives of General Psychiatry*, 2003, 60.1: 39-47.
- OWENS, N. C.; OOTSUKA, Y.; KANOSUE, K. & MCALLEN, R. M. Thermoregulatory control of sympathetic fibres supplying the rat's tail. *The Journal of physiology*, 2002, 543.3: 849-858.
- PAPP, Mariusz; WILLNER, Paul; MUSCAT, Richard. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology*, 1991, 104.2: 255-259.
- PARK, Hue Jung; STOKES, J. A.; PIRIE, E.; SKAHEN, J.; SHTAERMAN, Y. & YAKSH, T. L. Persistent Hyperalgesia in the Cisplatin-Treated Mouse as Defined by Threshold

Measures, the Conditioned Place Preference Paradigm and Changes in Dorsal Root Ganglia Activated Transcription Factor 3: The Effects of Gabapentin, Ketorolac and Etanercept. *Anesthesia and analgesia*, 2013, 116.1: 224.

PATKINA, Nadezhda A.; ZVARTAU, Edwin E. Caffeine place conditioning in rats: comparison with cocaine and ethanol. *European neuropsychopharmacology*, 1998, 8.4: 287-291.

PEARCE, John M.; HALL, Geoffrey. A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychological review*, 1980, 87.6: 532.

PLIAKAS, Andrea M.; CARLSON, R. R.; NEVE, R. L.; KONRADI, C.; NESTLER, E. J. & CARLEZON, W. A. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *The Journal of Neuroscience*, 2001, 21.18: 7397-7403.

PRUS, A. J.; JAMES, J. R.; ROSECRANS, J. A. Conditioned Place Preference. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009. Chapter 4.

RÁCZ, Ildikó; ZIMMER, Andreas. Animal models of nociception. *Standards of Mouse Model Phenotyping*, 2009, 221-235.

ROKYTA, Richard. *Bolest a jak s ní zacházet: učebnice pro nelékařské zdravotnické obory*. Grada, 2009.

ROMA, Peter G.; RILEY, Anthony L. Apparatus bias and the use of light and texture in place conditioning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2005, 82.1: 163-169.

SHERRINGTON, Charles S. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *The Journal of Physiology*, 1906, 34.1-2: 1.

SHIMIZU, Isao; IIDA, T.; GUAN, Y.; ZHAO, C.; RAJA, S. N.; JARVIS, M. F. & CATERINA, M. J. Enhanced thermal avoidance in mice lacking the ATP receptor P2X₃. *Pain*, 2005, 116.1: 96-108.

SIMONE, Donald A.; KAJANDER, Keith C. Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *Journal of neurophysiology*, 1997, 77.4: 2049-2060.

SORGE, Robert E.; MARTIN, L. J.; ISBESTER, K. A.; SOTOCINAL, S. G.; ROSEN, S.; TUTTLE, A. H.; & MOGIL, J. S. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nature methods*, 2014.

SOTOCINAL, Susana G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A. H.; MARTIN, L. J.; WIESKOPF, J. S. & MOGIL, J. S. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular pain*, 2011, 7.1: 55.

STAMFORD, J. A. Descending control of pain. *British Journal of Anaesthesia*, 1995, 75.2: 217-227.

STASIAK, Karen L.; MAUL, D.; FRENCH, E.; HELLYER, P. W. & VANDEWOUNDE, S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2003, 42.4: 13-20.

STEFFENS, H.; SCHOMBURG, E. D. Convergence in segmental reflex pathways from nociceptive and non-nociceptive afferents to alpha-motoneurons in the cat. *The Journal of physiology*, 1993, 466.1: 191-211.

SUBEDI, Bishnu; GROSSBERG, George T. Phantom limb pain: mechanisms and treatment approaches. *Pain research and treatment*, 2011, 2011.

SUZUKI, Tsutomu; KISHIMOTO, Y.; OZAKI, S. & NARITA, M. Mechanism of opioid dependence and interaction between opioid receptors. *European Journal of Pain*, 2001, 5.SA: 63-65.

TERMAN, Gregory William; SHAVIT, Y.; LEWIS, J. W.; CANNON, J. T. & LIEBESKIND, J. C. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science*, 1984, 226.4680: 1270-1277.

TREEDE, Rolf-Detlef; KENSHALO, D. R.; GRACEY, R. H. & JONES, A. K. The cortical representation of pain. *Pain*, 1999, 79.2: 105-111.

TSURUOKA, Masayoshi; MATSUI, Aiko; MATSUI, Yoichiro. Quantitative relationship between the stimulus intensity and the response magnitude in the tail flick reflex. *Physiology & behavior*, 1988, 43.1: 79-83.

TZSCHENTKE, Thomas M. Review on CPP: Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction biology*, 2007, 12.3-4: 227-462.

URBAN, Rochelle; SCHERRER, G.; GOULDING, E. H.; TECOTT, L. H. & BASBAUM, A. I. Behavioral indices of ongoing pain are largely unchanged in male mice with tissue or nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. *Pain*, 2011, 152.5: 990-1000.

VIERCK, Charles J.; ACOSTA-RUA, A.; NELLIGAN, R.; TESTER, N. & MAUDERLI, A. Low dose systemic morphine attenuates operant escape but facilitates innate reflex responses to thermal stimulation. *The Journal of Pain*, 2002, 3.4: 309-319.

VIERCK, Charles J.; ACOSTA-RUA, A. J.; ROSSI, H. L. & NEUBERT, J. K. Sex differences in thermal pain sensitivity and sympathetic reactivity for two strains of rat. *The Journal of Pain*, 2008, 9.8: 739-749.

WALCZAK, Jean-Sébastien; BEAULIEU, Pierre. Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: the double plate technique. *Neuroscience letters*, 2006, 399.3: 240-244.

WANG, Jing; GOFFER, Y.; XU, D.; TUKEY, D. S.; SHAMIR, D. B.; EBERLE, S. E. & ZIFF, E. B. A single sub-anesthetic dose of ketamine relieves depression-like behaviors induced by neuropathic pain in rats. *Anesthesiology*, 2011, 115.4: 812.

WILLIS JR, Wm D. Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review. *Progress in brain research*, 1988, 77: 1-29.

WILLNER, Paul; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S. & MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 1987, 93.3: 358-364.

YEOMANS, David C.; PROUDFIT, Herbert K. Characterization of the foot withdrawal response to noxious radiant heat in the rat. *Pain*, 1994, 59.1: 85-94.

ZHUO, Min; WU, Gongxiong; WU, Long-Jun. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain*, 2011, 4.31: 1.